

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

27.10.2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application:

2004年 9月22日

REC'D 16 DEC 2004

出願番号  
Application Number:

特願2004-274775

WIPO PCT

[ST. 10/C]:

[JP2004-274775]

出願人  
Applicant(s):

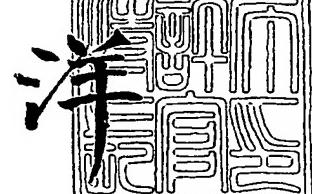
帝人株式会社

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年12月 3日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小川



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P37983  
【提出日】 平成16年 9月22日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 A61L 27/00  
A61L 31/00

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 伊東 雅弥

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 福富 千秋

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 北薙 英一

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人株式会社 東京研究センター内  
【氏名】 兼子 博章

【特許出願人】  
【識別番号】 000003001  
【氏名又は名称】 帝人株式会社

【代理人】  
【識別番号】 100099678  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 三原 秀子

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 206048  
【納付金額】 16,000円

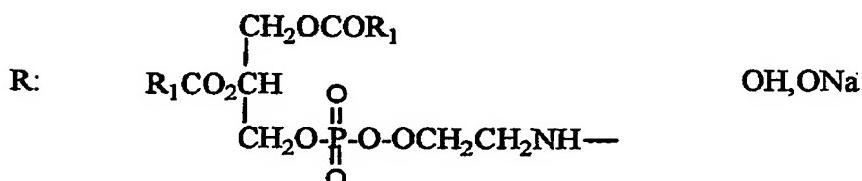
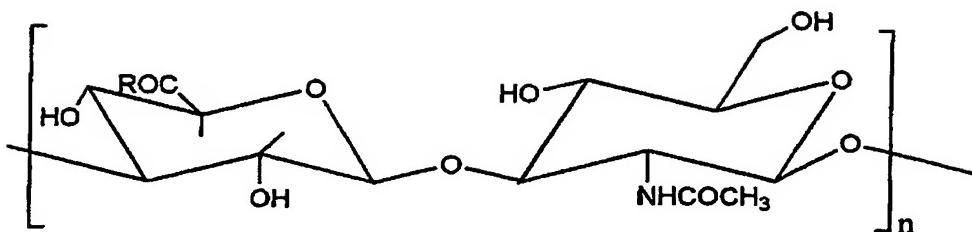
【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 要約書 1  
【包括委任状番号】 0203001

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

下記式 (1)

【化 1】



· · · · (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONa、または上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10～28のアルキルもしくはアルケンを示す。)

で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1～50当量であるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。

【請求項 2】

該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである請求項1に記載の関節軟骨治療用材料。

【請求項 3】

ハイドロゲルである請求項1または2に記載の関節軟骨治療用材料。

【書類名】明細書

【発明の名称】関節軟骨治療用材料

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料に関する。

【背景技術】

【0002】

軟骨は生体内で数少ない無血管系の組織の1つであり、元の組織に再建することは難しいとされている。外傷による軟骨欠損や離断性骨軟骨炎など限局した軟骨病変に基づく変形性関節症の発症を抑えるため、種々の治療法が試みられてきた。

【0003】

自家軟骨細胞または骨髄細胞から間葉系幹細胞を採取して分化した軟骨細胞を、細胞のみ、あるいは培養基材(Scaffold)に培養して軟骨欠損部に移植する自家軟骨細胞移植(Autologous Chondrocytes Implantation; ACI)が試みられている(非特許文献1, 2, 3)。

【0004】

また、自家軟骨細胞を生体外で培養する際に、より生体内環境に近いとされる3次元培養が積極的に試みられており、培養基材としては、コラーゲン、アルギン酸、フィブリンなど体内で安全と認められている材料が用いられている。そのうちコラーゲンについては、アテロコラーゲンを用いた手法を越智らが開発し、臨床試験が始まっている(特許文献1)。しかし、コラーゲンは生体吸収性は示すものの、抗原性を完全に除去することは困難であり、また未知のウイルス感染などの危険性を否定することが出来ないなどの課題がある。

【0005】

これに対し、ヒアルロン酸は関節軟骨を形成する細胞外基質の構成成分であり、軟骨との親和性が高い。さらにヒアルロン酸は動物由来の原料を含まない発酵法で生成することができるため、コラーゲンとは異なり未知のウイルス感染などの危険性は低い。そこで最近では、再生医療においてヒアルロン酸を利用した膝軟骨損傷治療の検討が行われている。例えば、ベンジルエステル化ヒアルロン酸(特許文献2、非特許文献4, 5, 6)、ビスエポキシド架橋ヒアルロン酸(特許文献3)、ジビニルスルfonyl架橋ヒアルロン酸(特許文献4, 5)、ホルムアルdehyド架橋ヒアルロン酸(特許文献6)、ヒドラジド架橋ヒアルロン酸などが挙げられる。

【0006】

しかし、いずれの場合もヒアルロン酸の生体吸収性を改善するために架橋剤を使用しているが、これらの架橋剤が非生体吸収性物質であるため安全性が懸念されており、安全性に優れた関節軟骨治療用材料が求められている。ちなみにここで言う“架橋”とは、共有結合からなる化学架橋以外に、静電相互作用によるイオン架橋、ファンデルワールス力、疎水性相互作用による物理架橋を指す。

【0007】

【特許文献1】特開2001-293081号公報

【特許文献2】米国特許第5939323号明細書

【特許文献3】特開平7-97401号公報

【特許文献4】米国特許第4582865号明細書

【特許文献5】米国特許第4605691号明細書

【特許文献6】特開昭60-130601号公報

【非特許文献1】N Engl J Med. 331, 889-95(1994)

【非特許文献2】J Bone Joint SurgAm. 76, 579-92(1994)

【非特許文献3】Artificial Organs . 25, 172-179(2001)

【非特許文献4】J.Biomed.Mater.Res. 42, 172-81(1998)

【非特許文献5】J.Biomed.Mater.Res. 46, 337-46(1999)

【非特許文献 6】 J. Orthop. Res. 18, 773-780 (2000)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

軟骨基質の産生を維持でき、かつ安全性に優れた生体由来物質からなる架橋剤を使用した関節軟骨治療用材料を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0009】

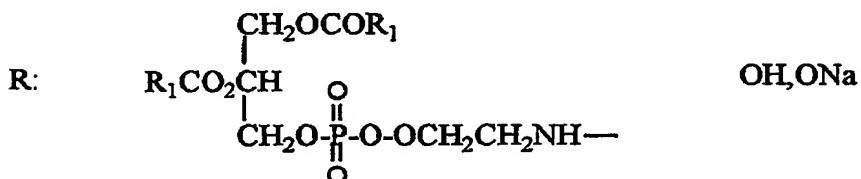
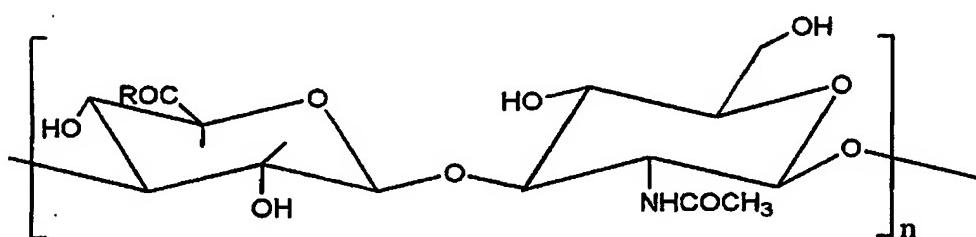
本発明の発明者は、ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物及びそれからなるハイドロゲルが、関節軟骨治療用材料として有用であることを見出し本発明に到達した。

【0010】

本発明は以下の通りである。

1. 下記式 (1)

【化1】



..... (1)

(nは、300～30,000の整数である。RはOH, ONaまたは上記構造式のホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体であり、R<sub>1</sub>は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10～28のアルキルもしくはアルケンを示す。)

で表されるヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなる化合物であって、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体残基の含有量が、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1～50当量であるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。

2. 該ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体が、ジオレイルホスファチジルエタノールアミンである1記載の関節軟骨治療用材料。

3. ハイドロゲルである1または2に記載の関節軟骨治療用材料。

【発明の効果】

【0011】

本発明の関節軟骨治療用材料は軟骨基質の産生を維持でき、生体由来物質からなる架橋剤を使用しており安全性に優れている。また正常部との結合や組織の連続性が良好であり、良好な修復能を有することから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明について詳述する。なお、これらの実施例等および説明は本発明を例示す

るものであり、本発明の範囲を制限するものではない。本発明の趣旨に合致する限り他の実施の形態も本発明の範疇に属し得ることは言うまでもない。

### 【0013】

本発明で使用されているヒアルロン酸は、動物組織から抽出したもの、または発酵法で製造したものどちらでも使用できる。発酵法で使用する菌株はストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産能を有する微生物であり、ストレプトコッカス・エクイ FM-100(特開昭63-123392号公報)、ストレプトコッカス・エクイ FM-300(特開平2-234689号公報)が挙げられる。これらの変異株を用いて培養、精製されたものを用いる。またヒアルロン酸の分子量は、約 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ のものが好ましい。なお本発明でいうヒアルロン酸は、そのアルカリ金属塩、例えば、ナトリウム、カリウム、リチウムの塩をも包含する。

### 【0014】

本発明で使用されているホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体は、動物組織から抽出したもの、または合成して製造したものどちらでも使用できる。ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体として以下のものが挙げられる。ジラウロイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドイルホスファチジルエタノールアミン、ジベヘノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリグノセロイルホスファチジルエタノールアミン、ジセロチオイルホスファチジルエタノールアミン、ジモンタノイルホスファチジルエタノールアミン、ジラウロオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジミリストオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、ジネルボノイルホスファチジルエタノールアミン、ジキメノイルホスファチジルエタノールアミン、ジリノレノイルホスファチジルエタノールアミン、ジヒラゴノイルホスファチジルエタノールアミン、ジアラキドノイルホスファチジルエタノールアミン、ジドコサヘキサエノイルホスファチジルエタノールアミン。その中でも、溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

### 【0015】

上記式(1)のRにおいて、R1は夫々同時または別個に置換または無置換の炭素数10~28のアルキル基もしくはアルケニル基であるが、なかでも炭素数14~20が好ましい。

その中でも、合成する際に使用する有機溶媒への溶解性の面からジオレオイルホスファチジルエタノールアミンが好ましい。

上記式(1)のRにおいて、nは、300~30,000であるが、なかでもnは1,000~10,000であることが好ましい。

ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体の含有量は、ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し、1~50当量である。

### 【0016】

本発明の関節軟骨治療用材料はヒアルロン酸の滞留性を高める目的でハイドロゲルであることが好ましく、ホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体の含有量が1当量より少ないとハイドロゲルを形成せず、また、50当量より多いと疎水性が高くなり不溶物が発生し、ハイドロゲルを形成しない。

### 【実施例】

#### 【0017】

以下の実施例により本発明の詳細をより具体的に説明する。しかし、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

本実施例に使用したヒアルロン酸ナトリウム、テトラヒドロフラン、0.1M HCl、0.1M NaOH、1-Ethyl-3-[3-(dimethylaminoo)propyl]-carbodi-imide(EDC)、1-Hydroxybenzotriazole(HOBt)、L-leucine methyl ester hydr

ochloride、消毒用エタノール、10%中性緩衝ホルマリン溶液、サフラニンO溶液は、和光純薬工業（株）、L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン(COA TSOME ME-8181)は日本油脂（株）、Fast Green FCFは、Polyscience（株））、Ethylenediamine-N, N, N', N'-tetraacetic acid, tetrasodiumsalt, tetrahydrate（以下EDTA）は同仁化学研究所（株）、ペントバルビタール（以下ネンブタール）は大日本製薬（株）、1%キシロカインはアストラゼネカ（株）、結晶ペニシリンGカリウム（以下ペニシリン）は萬有製薬（株）、ヨードチンキは吉田製薬（株）、3%アテロコラーゲンは高研（株）のものを使用した。また、本実施例に使用したニュージーランド白色家兔（以下NZWウサギ）は雄性であり、日本SLC（株）より購入して体重3.0～3.5kgになるまでゲージにて通常飼育を行った。手術時の週齢は24～28週齢であった。その他の試薬については、のものを使用した。

### 【0018】

#### [実施例1]

##### (1) 化合物合成

L- $\alpha$ -ジオレイルホスファチジルエタノールアミン110mg(0.000033mol)(ヒアルロン酸のカルボキシル基100当量に対し10当量)を、テトラヒドロフラン／水=1／1(v/v)200mlに溶解した。この溶液に、ヒアルロン酸ナトリウム500mgを加え、0.1M HCl/0.1M NaOHを添加し、pH 6.8に調整した。1-Ethyl-3-[3-(dimethylamino)propyl]-carbodiimide(EDC) 30mg(0.000033mol)、1-hydroxybenzotriazole(HOBt) 25mg(0.000033mol)をテトラヒドロフラン／水=1／1の水溶液10mlに溶解し反応系に添加し、終夜攪拌を行った。攪拌後、透析精製を行い、凍結乾燥し目的物を得た。確認は<sup>1</sup>H NMR(日本電子JNM-a1ph400)により行い、目的物の生成を確認した。

凍結乾燥品30mgをイオン交換水970mgに溶解し、濃度3wt%のハイドロゲルを調整した。

### 【0019】

##### (2) 動物評価

調整したヒアルロン酸ハイドロゲルの生物学的評価を以下の方法により行った。通常飼育したNZWウサギの耳介静脈にペントバルビタールを投与し、全身麻酔下で以下の手術を施した。両側の後肢膝関節周辺部を剃毛し、エタノール消毒した後、キシロカインを局所に数回に分けて筋肉内投与した。膝関節内側を切開し、膝蓋骨を脱臼させることにより大腿骨膝蓋溝を露出させた。内側副靱帯から5mmほど上部の滑車溝部分に、手術用ドリルで内径5mm、深さ5mmの円筒形の欠損部を作製することによって、膝関節軟骨全層を欠損させた。そこに欠損部に上記で得られたハイドロゲルを埋入したのち、膝蓋骨を元の位置に戻して筋肉を手術用縫合糸にて縫合した。感染防止のためにペニシリンを患部に滴下したのち、皮膚を縫合した。最後にヨードチンキで消毒し、ゲージに戻して通常の飼育を行った。術後8週間目に屠殺して欠損部位を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液に浸漬、固定させ、組織学的評価に供した。固定した組織を、脱脂、EDTA脱灰した後、パラフィンに包埋し、欠損部の中心部近傍を矢状面に薄切して、標本を作製した。作製した標本にサフラニンO染色を施し、以下の項目についてスコア化することにより組織学的な評価を行った。

組織学的評価に用いたスコアグレードは、Wakitani S et.al., J Bone Joint Surg Am. 76, 579-92(1994)の変法であるMakino T et al., Kobe J Med Sci. 48: 97-104(2002)に従って実施した。表1に組織学的評価をする際に用いた項目と得点を示す。

### 【0020】

【表1】

## 軟骨欠損に対する組織学的評価

A. 細胞の形態	4 硝子軟骨のみで構成、正常 3 大半が硝子軟骨で修復 2 線維軟骨が大半 1 ほとんどが非軟骨組織で修復 0 軟骨組織が全くない
B. サフラニンOによる基質の染色性	3 (正常部位と比較して) 同等の染色性 2 少し低下 1 かなり低下 0 染色性なし
C. 表面の形態*	3 平滑(>3/4) 2 中程度(1/2-3/4) 1 でこぼこ(1/4-1/2) 0 ひどくでこぼこ(<1/4)
D. 軟骨組織の厚さ**	2 >2/3 1 1/3-2/3 0 <1/3
E. 正常部分近傍の軟骨に対する修復部分の一々	2 両端とも一体化 1 方端が一体化 0 両端とも一体化していない
合計 A-E	14

\* 欠損部位での全体に対する平滑な部分の割合

\*\* 修復部の正常部位と比較した平均の厚さ

## 【0021】

全体の合計は14点であり、項目によって3～5段階で評価する。組織の修復度が高いほど、すなわち、正常組織に近い修復を示すほど、14点に近づくことになる。すなわち、項目は、修復された組織の形態(0点から4点)、基質の染色性(0点から3点)、表面の状態(0点から3点)、軟骨組織の厚さ(0点から2点)、非欠損部との結合度(0点から2点)、についてであり、本法では正常組織に近いほど得点が高くなる。

## 【0022】

術後8週目に欠損部位を摘出して組織学的評価を行った結果を表2に示す。術後8週間目において修復された軟骨組織は、ほとんどが硝子軟骨様を呈しており、基質が良好に産生をしている様子が観察された。また、正常部との結合も良好であり、組織の連続性を認めた。

## 【0023】

## [比較例1]

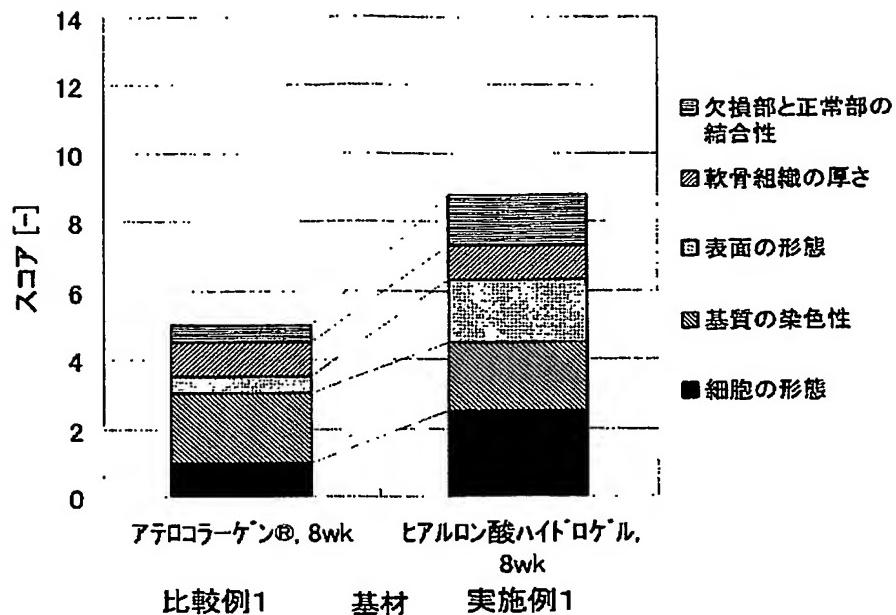
実施例1と同様に、大腿骨滑車溝に欠損部を作製したのち、アテロコラーゲンゲル(登録商標)(I型、高研)を埋入して整復し、術後8週目に欠損部位を摘出して組織学的評価を行った結果を表2に示す。

実施例1と比較すると、基質の染色性は他の条件との差が認められないものの、表面は平滑になっておらず、軟骨下骨が全く再建されていなかった。

## 【0024】

【表2】

## 術後8週におけるウサギ膝関節の組織学的評価



## 【0025】

以上の結果より、実施例1は、基質の染色性と修復した軟骨組織の厚さにおいては比較例1と同等であるが、表面の状態と正常組織との組織学的な連続性については正常組織により近い修復であり、全体として良好な修復能を示すことが確認できた。

## 【0026】

これより本発明のヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミンジオレオイルからなるヒアルロン酸化合物は比較例（アテロコラーゲン）よりも軟骨治療用材料として優れていることが分かった。

## 【産業上の利用可能性】

## 【0027】

本発明の関節軟骨治療用材料は良好に軟骨基質の産生を維持でき、安全性に優れていることから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【書類名】要約書

【要約】

【課題】軟骨基質の産生を維持でき、骨分化が進行しないようにコントロールできる関節軟骨治療用材料を提供する。

【解決手段】ヒアルロン酸とホスファチジルエタノールアミン及びその誘導体とからなるヒアルロン酸化合物からなる関節軟骨治療用材料。安全性に優れていることから、再生医療における関節軟骨治療用材料として有用である。

【選択図】なし

特願 2004-274775

出願人履歴情報

識別番号 [000003001]

1. 変更年月日 1990年 8月28日

[変更理由] 新規登録

住所 大阪府大阪市中央区南本町1丁目6番7号

氏名 帝人株式会社